

A mesenchymális őssejtek regeneratív és immunmoduláló hatása

Kiss Judit

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

ELTE TTK Biológia Doktori Iskola
Strukturális és funkcionális biológia
Doktori Program



A Doktori Iskola vezetője:
Programvezető:
Témavezető:

Prof. Dr. Erdei Anna
Prof. Dr. Sass Miklós
Dr. habil. Uher Ferenc
OGYK/OVSZ

2010

1. Bevezetés

A csontvelőből izolálható szöveti őssejtek több okból is számot tarthatnak a regeneratív orvoslás kutatóinak érdeklődésére. A hematopoietikus őssejtek (**HSck**) *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is bizonyították, hogy a vérképzés fenntartása mellett megfelelő körülmények között képesek részt venni más szövetek regenerációjában is. Hasonlóképp a mesenchymális őssejtek (**MSck**) a csontvelői stroma sejtek pótlása és a vérképző sejtek megfelelő működését biztosító mikrokörnyezet (őssejt niche) létrehozása mellett szintén képesek akár nem mesenchymális eredetű sejtípusok kialakítására is, valamint számos esetben számoltak be arról, hogy sejtpusztulással járó betegségek esetében javulást értek el segítségükkel. A hatás mechanizmusa igen összetett, de egyik nagyon fontos összetevője az MSck figyelemreméltó immunológiai tulajdonságaiban rejlik. Ezen sejtek allogén vagy xenogén transzplantáció esetében sem váltanak ki jelentős immunválaszt, emellett pedig erős immunszuppresszivitást mutatnak.

Munkánkban először az erős immunszuppresszív és gyulladáscsökkentő aktivitással rendelkező, az MSck által nagy mennyiségben termelt endogén lektinnek, a galektin-1-nek a vérképző ős- és elődsejtek Cy/G-CSF-indukált mobilizációjára gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Az I-es típusú cukorbetegség őssejtterápiájával sok kutatócsoport próbálkozott, azonban a kapott eredmények nem

egyértelműek. Ezért munkánk következő részében egy olyan, kombinált kezelési módot dolgoztunk ki a könnyen hozzáférhető csontvelői őssejtek felhasználásával, amely valóban hosszú távon képes a diabetes gyógyítására, valamint a gyógyulás mechanizmusát is megpróbáltuk felderíteni.

Az egészséges vérképzés elképzelhetetlen a stromasejtek alkotta őssejt niche szabályozása nélkül. Ezért két, a hematopoietikus rendszert érintő betegség (myelodysplasiás szindróma és myeloma multiplex) esetében megvizsgáltuk, hogy a hibás vérképző klón önmagában okozza-e a problémát, vagy esetleg bizonyos esetekben a stroma megváltozása is szerepet játszik a betegség kialakulásában?

2. Módszerek

A gal-1 fehérje vizsgálatánál modellrendszerként a csontvelői őssejtek Cy/C-CSF általi mobilizációját használtuk BDF1 egereken. A kezelt állatok vérben található őssejtek *in vivo* repopulációs képességét halálosan besugárzott recipiensek csontvelő transzplantációjával mutattuk ki. A vérképző elődsejtek számát a vér- és csontvelőmintákban lágygél kolóniastesztben határoztuk meg. A magvas csontvelői sejtek felszíni markereinek expresszióját áramlási citometriával vizsgáltuk. A vérmintákban a limfociták, granulociták és monociták számát Giemsa festés mellett állapítottuk meg.

Az I-es típusú diabetes modelljéül szolgáló egereknél a betegséget STZ kezeléssel indukáltuk. Az összejt transzplantációknál a szubletálisan besugárzott cukorbeteg nőstény C57Bl/6 recipienseknek hím állatokból frissen izolált csontvelői sejteket (BMC), illetve szingén vagy allogén mesenchymális összejteket (MSC)adtunk be.

Az összejt niche vizsgálatánál felhasznált minták kezeletlen MDS-es illetve MM-es betegektől, valamint egészséges donoroktól származtak. A kolóniaképző sejtek (progenitorok) számát lágygél kultúrában határoztuk meg. A vérképzést támogató képességet macskakő kultúrában (CAFC) vizsgáltuk. Az MSCk plaszticitásának vizsgálatához Pittenger és mtsai cikke alapján állítottuk össze a csont, illetve zsír irányú differenciációt támogató tápfolyadékokat.

3. Eredmények

A Gal-1 nagymértékben gátolta a HSPC-k Cy/G-CSF okozta mobilizációját, valamint dózis- és időfüggő módon csökkentette a perifériás monocytózt és neutrofilát. Ezzel szemben a csontvelőben a vérképző elődsejtek száma növekedett a gal-1 kezelés hatására. A gátló hatást a lektin a mobilizáló kezelés második felében fejtette ki. Emellett a galektin-1 fehérje gátolta a csontvelői eredetű sejtek SDF-1 által kiváltott transzendotheliális migrációját, azonban magára a kemotaxisra nem volt hatással.

A cukorbeteg egereknél 10^6 BMC/ 10^5 MSC egyidejű adásával a vércukor- és szérum inzulin szint gyors normalizálódását, valamint a hasnyálmirigy szigetek regenerációját érték el. Önmagában sem az MSC, sem a BMC kezelés nem volt hatásos. A regenerációban nem lehet szerepe a beadott őssejtek inzulintermelő szigetsejtté alakulásának, mivel a gyógyult állatokban nem sikerült donor eredetű β -sejtet kimutatni. Valószínűbb, hogy a beadott sejtek az endogén regenerációt segítették elő. Kimutattuk, hogy a donor MSCk hatására eltűntek a β -sejt specifikus, autoreaktív T-sejt klónok a kezelt cukorbeteg egerek hasnyálmirigyéből.

MDS esetében a betegek stromájának mind a vérképzést támogató képessége, mind a plaszticitása elmaradt az egészséges mesenchymális sejtektől. Ezzel szemben a MM-es betegeknél a stroma elváltozása nem volt megfigyelhető.

4. Következtetések

A galektin-1 hatása a sejtek transzendotheliális migrációjának gátlásán alapul, életképességüket és *in vitro* mérhető kemotaktikus aktivitásukat nem befolyásolja. Ez részben megmagyarázza a lektin *in vivo* megfigyelhető erőteljes gyulladáscsökkentő hatásának mechanizmusát.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az STZ indukált diabetes esetében a kombinált őssejtkezelés sikerének kulcsa, hogy a kétféle őssejtípus egymás hatását egészíti ki a cukorbetegség gyógyításában. Amellett, hogy a beadott sejtek elősegítik a beteg hasnyálmirigyének endogén regenerációját, a mesenchymális őssejtek egyedülálló immunológiai tulajdonságaik révén képesek megakadályozni, hogy az immunrendszer újra és újra elpusztítsa a keletkező β -sejteket, így biztosítva végleges gyógyulást. Emiatt a kezelés diabetesben, illetőleg más, autoimmun eredetű sejtpusztulással járó betegségben szenvedő embereknél is hatásos lehet a jövőben.

Megállapíthatjuk, hogy az MDS – szemben a MM-el - egy olyan betegség, ami nem csak egy vérképző klón hibás működésére, illetve neoplasztikus transzformációjára vezethető vissza. Ezeknek a betegeknek a csontvelői stromája is beteg, ami véleményünk szerint MSC-ik idő előtti öregedésére vezethető vissza.

5. A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

1. Judit **Kiss**, Aliz Kunstár, Roberta Fajka-Boja, Valéria Dudics, József Tóvári, Ádám Légrádi, Éva Monostori and Ferenc Uher (2007) *Function of Human Galectin-1: Inhibition of Hematopoietic Progenitor cell mobilization*. Experimental Hematology, 35: 305-313 (IF=3,15)
2. Veronika S. Urbán, Judit **Kiss**, János Kovács, Elen Gócza, Virág Vas, Éva Monostori, Ferenc Uher (2007) *Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of Diabetes*. Stem Cells, 26: 244-253. (IF=7,74)
3. Gergely Varga, Judit **Kiss**, Judit Várkonyi, Virág Vas, Péter Farkas, Katalin Pálóczi and Ferenc Uher (2007) *Inappropriate Notch Activity and Limited Mesenchymal Stem Cell Plasticity in the Bone Marrow of Patients with Myelodysplastic Syndromes*. Pathology Oncology Research, 13: 311-319. IF=1,27

IF összesen: 12, 16

6. További közlemények:

1. Zsuzsanna Kertész, Virág Vas, Judit **Kiss**, Veronika S. Urbán, Éva Pozsonyi, András Kozma, Katalin Pálóczi, Ferenc Uher. (2006) *In vitro expansion of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the presence of immobilized Jagged-1 and early acting cytokines.* Cell biology International, 30: 401-405. (IF=1,36)

2. **Kiss** Judit, Urbán S. Veronika, Dudics Valéria, VasVirág, Uher Ferenc (2008) *A mesenchymális őssejtek és az immunrendszer – immunszuppresszió gyógyszerek nélkül?* Orvosi Hetilap, 149: 339-346.

3. Urbán S. Veronika, **Kiss** Judit, Vas Virág, Kovács János, Uher Ferenc. (2006) *A diabetes mellitus őssejtterápiája: eredmények, lehetőségek, és kérdőjelek.* Orvosi Hetilap, 147:791-797.

4. Beáta Hegyi, Bernadett Sági, János Kovács, Judit **Kiss**, Veronika S. Urbán, Gabriella Mészáros, Éva Monostori, Ferenc Uher (2010) *Identical, similar or different? learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall* International Immunology, in press (IF=3,18)

IF összesen: 4,54